應用高分辨率熔解 (High-Resolution Melting, HRM) 進行番茄分子標誌輔助選拔

農試所作物組 康樂

一、前言

番茄果實營養豐富，外型變化多元，是重要的世界性蔬菜作物，在我國的日常生活飲食中佔有重要的角色。由於番茄的市場需求大，經濟價值高，各國的公私部門陸續投入相當多的資源進行番茄相關研究，經由長年累積研究的成果，番茄的基因體不僅已經完成解序，許多影響番茄生長的重要園藝特性及抗耐病特性等基因也已經完成定位，甚至可瞭解部分基因的詳細序列與運作之原理，在蔬菜作物中，番茄成為相關遺傳研究最為清楚的作物。

另一方面，由於番茄在一般栽培模式下必須不斷重新種植，因此對於優良種苗的需求也相當龐大，加上種子細小，番茄雜交一代品系的種子的單價甚至比相同重量的黃金還高。因此，國內外許多種苗公司紛紛投注資源進行優良品種的選育，競爭相當激烈。

一般來說，要選育出一個品系，從一開始的育種族群建立後，大概需要8至10年才能進入品系比較試驗，在這段期間，育種人員必須不斷的在每株都不同的育種族群中，挑選最佳的個體來當作下一期作的親本，這個族群如果越大，就有比較高的機率選出更好的個體，在相同時間內選育出更好的品種。

二、分子標誌輔助育種

在傳統育種中，育種人員在適當環境下栽培番茄，觀察每株的生長狀況並進行篩選，但是大量種植的成本很高，每株成本可能超過台幣100元，若是以每期種植1000株的規模、種植8個期作來算，一個育種族群的成本需求就接近80萬，而這還不能保證選出適當的品種。

為了可以更有效率的選育出更好的品種，隨著分子生物技術的進步，應用已知公開的基因序列資訊，設計不同特性之分子標誌，在種子發芽後就進行篩選，可以有效

作　　者：康樂助理研究員
連絡電話：04-23317133

應用高分辨率熔解（HRM）進行番茄分子標誌輔助選拔

降低需要種植的族群數，由於番茄的研究相當完善，進行分子輔助育種已經是番茄育種上可行的方式。

不過，從已知公開基因序列資訊，要轉成可穩定且大量快速使用的分子標誌，常常還是需要不斷的嘗試，而且不同的分子標誌分型系統有各自的優勢與限制，就像我們拿著食譜，卻不一定可以像大廚一樣做出好吃的菜色。

筆者有幸在107年8月至108年8月之間，藉由執行「國際化跨域創新與科研產業化人才培育」計畫，並感謝番茄研究室主持人Dr. Samuel Hutton的接待，在美國佛羅里達大學(University of Florida)的墨西哥灣沿岸教育及推廣中心(GCREC, IFAS)，進行番茄重要特性之選拔與育種合作研發。

該實驗室進行番茄育種已近百年，除了歷年來選育出眾多重要品種，近年來更是發表了許多抗病基因，並大量應用高分辨率熔解(High-Resolution Melting, HRM)分型系統，進行分子標誌輔助選拔，成功育出具有多重抗病特性的優良番茄品系，有鑑於國內運用此系統的報告較少，因此撰寫本文介紹此較新發展的分型系統。

三、高分辨率熔解(High-Resolution Melting, HRM)進行分子標誌分型的運作原理

植物的許多特性是受到遺傳物質控制，而不同的遺傳物質有著不同的核苷酸序列，高分辨率熔解(High-Resolution Melting, HRM)主要是利用具有不同序列的遺傳物質片段，由於從雙股螺旋構型熔解變成單股狀態的溫度略有不同，當我們在不同溫度下很精細的觀察遺傳物質的熔解現象，可偵測較小如單一核苷酸多型性(SNP)、及較大範圍如小片段缺失或重複等遺傳物質序列差異，敏感度及設計彈性相當大，且不像許多其他的分型系統須加掛不同螢光於特定序列，因此本系統可大量且便宜的進行目標遺傳物質的分型。

此分型系統的分子標誌的運作方法主要是在DNA序列中，於具有差異的位點前後，設計並合成具有專一性、稱為引子的小片段遺傳物質，然後進行聚合酶連鎖反應(PCR)，將成對引子之間的序列增殖放大，最後把產物逐漸升溫熔解。

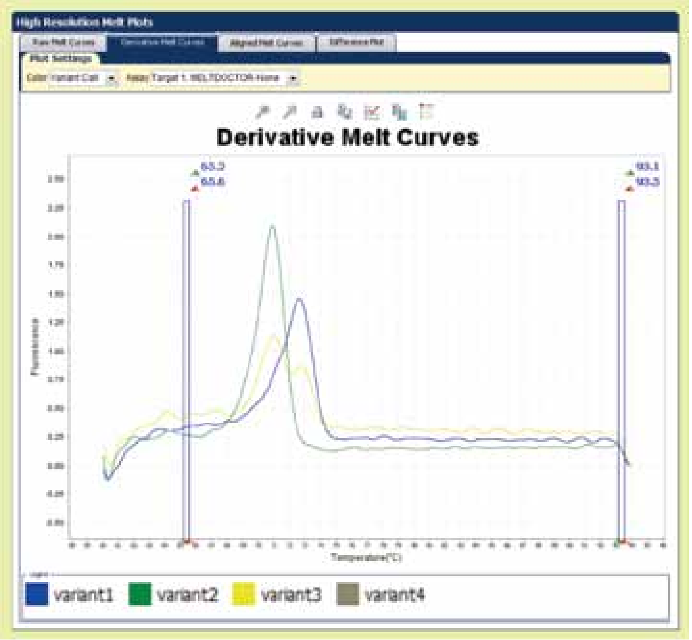
偵測熔解的方法是在試劑中，添加了可與雙股螺旋結合的如SYBR Green或EvaGreen等螢光染劑，因此在升溫的過程中，一旦產物開始熔解、螢光染劑無法與之結合，螢光強度便會快速下降。因此藉由偵測螢光強度的變化曲線，即可了解產物在什麼溫度熔解，進而將產物分型，由於不同DNA的熔解溫度差異有時不大，在最後一段的升溫過程中必須以高精細度進行緩慢升溫並即時偵測螢光強度，因此稱為高分辨率熔解。

不過由於每個位點在進行試驗及偵測具有些微誤差，因此良好的分子標誌即為在完成聚合酶連鎖反應後，不同產物具有較大的熔解溫度差異，例如應用

在單一核苷酸多型性時，因為雙股狀態下，成對的核苷酸鍵結的數量影響熔解溫度較大，如該位點是由兩個鍵結的A或T，轉成三個鍵結C或G，相較於兩個鍵結的A和T、或是三個鍵結的C和G彼此互換，會有較好的分型效果。

四、參訪與技術應用心得分享

根據筆者在佛羅里達大學墨西哥灣沿岸教育及推廣中心番茄研究室的研習紀錄，該研究室在每期作的育種過程中，耗時約一個月，大約可抽取5萬株番茄幼苗的遺傳物質，並進行了共約12萬筆的高分辨率熔解分型，所使用的設備為6台一般的PCR機器及1台可進行高分辨率熔解的即時定量聚合酶連鎖反應(real time PCR)機器；人力安排上為1個人負責採樣、2個人進行DNA抽取、PCR試劑配置及上機、以及1個人負責高分辨率結果判讀分析，整個流程相當有效率。



圖一、分子標誌Sw5對照品系的熔解曲線。

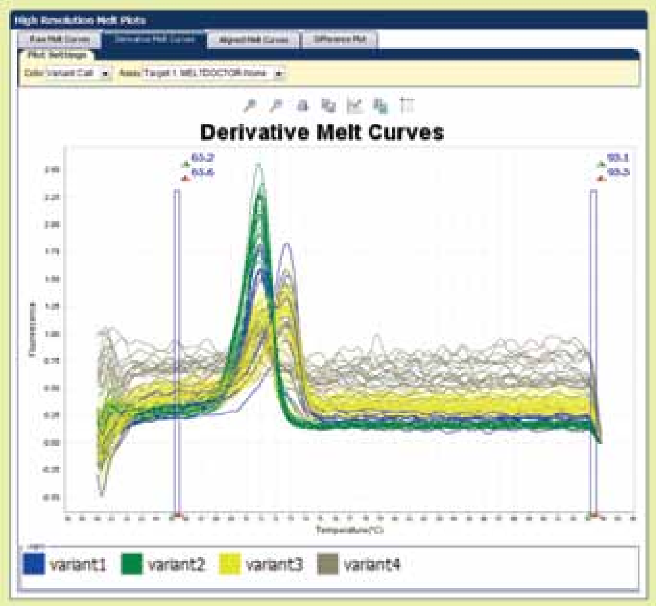
其中，必須有1個人力進行結果判定，是因為目前的電腦軟體系統進行自動分型的效果不佳，還不像其他應用不同螢光進行分型的分子標誌系統來的穩定，仍然需要有經驗的人進行大量圖表的分析判讀；但其他包括採樣、DNA抽取及PCR配置及上機設定已有固定的標準操作流程，操作人員僅須具備一般實驗室操作能力即可穩定進行各項操作。筆者當時即依標準操作流程就可完成各項試劑的配置，顯見這樣的系統已相當穩定。

在成本上，雖然並不清楚詳細的精算過程，但根據對方實驗室表示，他們的耗材成本平均一個資料點大約為25美分。成本較低是該實驗室採用高分辨率熔解系統的主要原因。

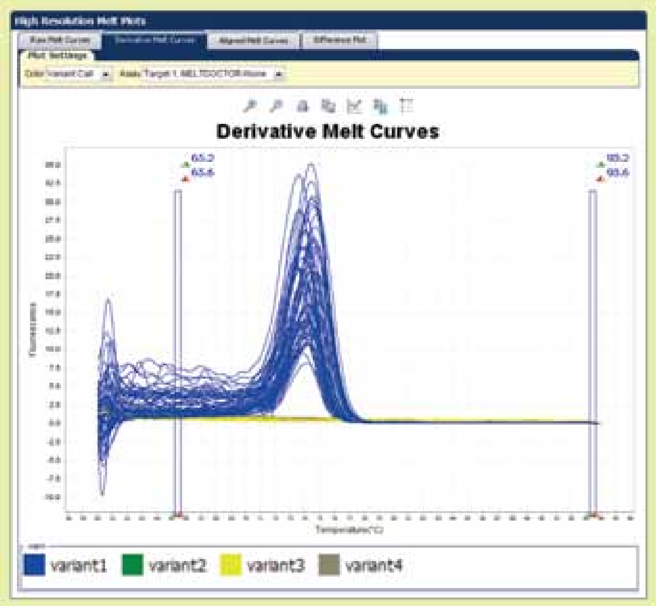
研習結束後，筆者在國內，合成相同序列的引子對，並在考量已有的人力及設備下，選用不同遺傳物質抽取方式、以及不同的PCR試劑、在不同的儀器下，參考各引子對原始的PCR條件進行符合測試試劑的微調，在分子標誌Sw5測試的結果，應用高分辨率熔解系統，已經可以成功地進行分型(圖一)，圖中三種顏色的曲線可清楚區分出不同的型別，但若以整個族群96個樣本來看(圖二)，可觀察到有許多樣本的雜訊較多(灰線)導致

分型不良，以及系統的自動分型判定錯誤，許多藍色線的熔解曲線其實應為綠色線或黃色線。

而應用在分子標誌Fcr的狀況，由於各個位點的熔解溫度誤差較大，且不同DNA之間的熔解溫度差異較小，導致無法有效分型(圖三)。經由檢討實驗流程，推測可能是因為應用快速萃取液進行樣本DNA的萃取時，內含的雜質可能較多所導致，因此將同樣的DNA萃取液進行稀釋，重新進行PCR及高分辨率熔解，結果發現各個樣本的熔解溫度誤差下降，可以進行有效的分型(圖四、圖五)，但是軟體的自動型別判斷仍然無法從曲線的形態中有效的判定出雜合型別。



圖二、分子標誌Sw5整個族群的熔解曲線。



圖三、優化前的分子標誌Fcr整個族群的熔解曲線。

從以上的結果顯示，雖然這些引子對在原先實驗室已經運作非常穩定，但是在不同的DNA萃取方式、不同的PCR試劑與條件及不同的機型運作下，分型的效果可能會有所變化，但大致上經由基本的試驗條件優化後，仍然具有良好的分型能力，確實符合了這個系統具有彈性較大的優點，但型別判讀上仍然須仰賴專業人工辨識分型，影響了整體的分型效率。

至於在耗材成本的估算，實驗室目前使用的是一次可以偵測96個樣本的Real Time PCR機器、每個樣本內總反應試劑體積為相對較高的20 μL、PCR試劑選用原廠較貴的預混液，在這樣的狀況下平均每個資料點的耗材成本約為台幣30.6元，遠低於種植於田間進行外表性狀評估。且若能使用一次偵測384個樣本

的系統或是降低試劑的總反應體積，應可把成本再降低，因此HRM分型系統儘管是剛移植回台灣，部分試劑的單價較高，但從耗材成本來看仍確實具有一定的優勢。

其中最重要的是，一旦要開發新的分子標誌，僅需合成一般新台幣幾百塊的短片段序列作為引子，不必花費上萬元在序列上加掛螢光，在研究上具有絕對的成本優勢。

另外若有大量的樣本的分析需求，前端PCR部分可以使用一般PCR機器運作，產物放大後再將整盤產物改置於較高價之Real Time PCR機器進行高分辨率熔解，降低設備需求。

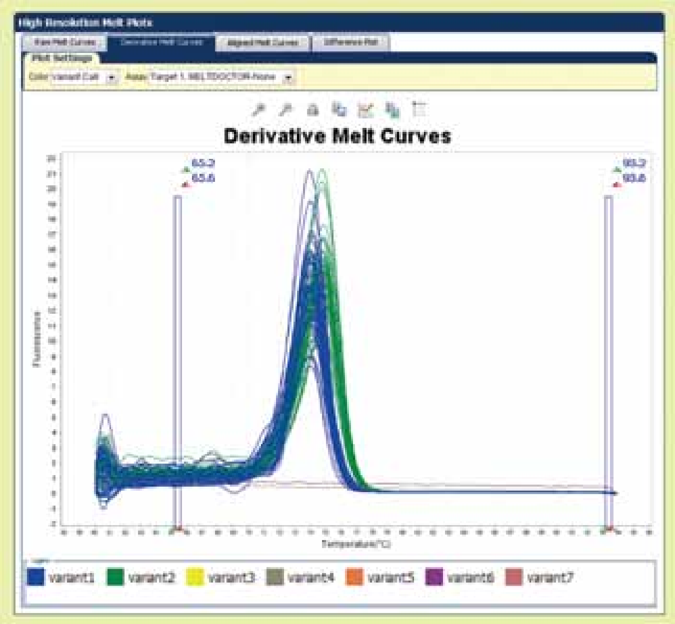
五、結語

目前本所蔬菜研究室透過HRM系統的引入，已具備超過20個番茄的重要抗病特性或其他園藝特性之分子標誌輔助品種選育能力，未來預計將應用於番茄育種計畫中，選育具多重抗病特性之優良番茄品系。

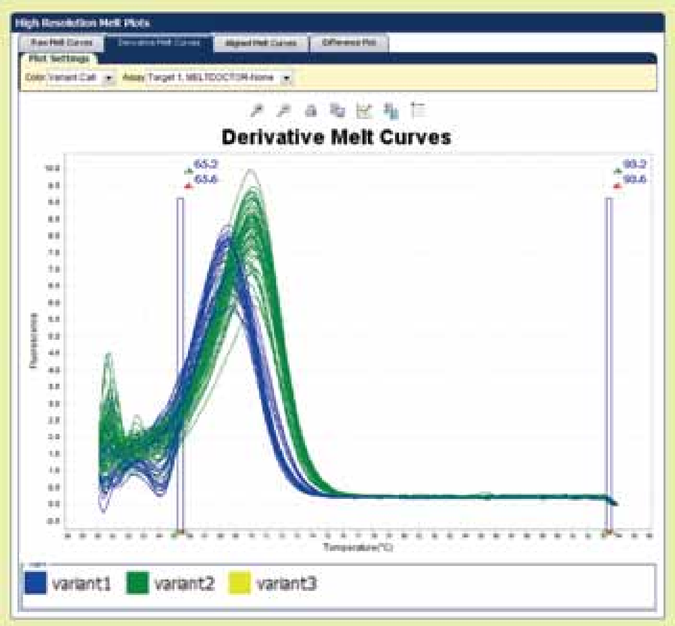
六、參考文獻

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics 8:597–608

Majid R. Foolad & Dilip R. Panthee (2012) Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding, Critical Reviews in Plant Sciences, 31:2, 93-123, DOI: 10.1080/07352689.2011.616057



圖四、優化後的分子標誌Fcr整個族群的熔解曲線。



圖五、優化後的分子標誌Ty6整個族群的熔解曲線。